

Triptofán és glükóz közötti Maillard-reakció vizsgálata*

DWORSCHÁK ERNŐ** és ÖRSI FERENC***

** Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

*** BME Biokémia és Elelmiszertechnológia Tanszék

Érkezett: 1975. április 25.

A triptofán az esszenciális aminosavak közül kémiaiilag a legérzékenyebbek közé tartozik, mert a különben sem túlságosan stabil indolgyűrű poláros tulajdonságot kölcsönöz számára (1).

Mivel a triptofán meghatározása a fehérjékben eléggé bonyolult, viszonylag kevés a hőkezeléséről, illetve a Maillard-reakcióban való viselkedéséről adatokat szolgáltató közlemények száma. Egyes szerzők (2, 3) hal és szójafehérjék hevítésekor a triptofán bomlását nagyobbban találták a lizinénél. Régebbi vizsgálataink szerint tejpor hevítésekor a triptofán limitáló aminosavvá válik, bomlásának reakciórendje, valamint a nedvességtartalomtól való függése eltér a lizin bomlásánál és az 5-hidroximetilfurfurok képződésénél leírt egyenletekétől (4). Újabb kísérleteink rámutattak arra, hogy a zsírok oxidatív lebomlása a fehérjékkel való kölcsönhatás során legjobban a triptofánt károsítja az esszenciális aminosavak közül (5).

A felsorolt jelenségek ismeretében a triptofán Maillard-reakciójának mélyebb tanulmányozása csak egyszerűbb modell-rendszerekben lehetséges úgy, hogy azt legutóbb a metioninnal kapcsolatban végeztük (6).

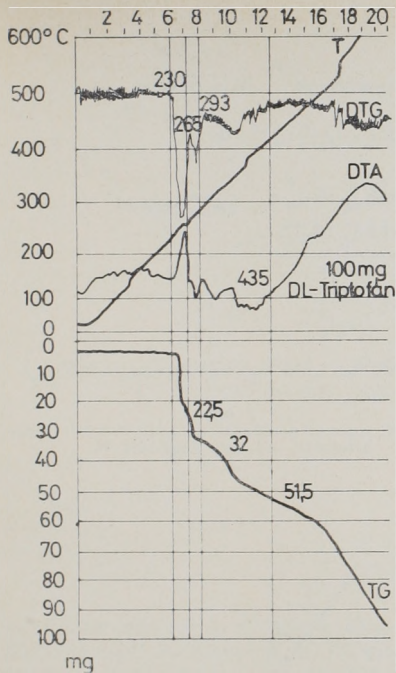
Nagyobb hőmérsékleten, a triptofán és glükóz közötti vízmentes ömledékben végbemenő reakciót *Erdey – Paulik* féle derivatográfban tanulmányoztuk (7).

A kísérletnek másik részét vizes, 0,2 M foszfát puffer oldatban pH = 3–13 intervallumban, 110–130 °C hőmérsékleti tartományban hajtottuk végre. A triptofán koncentrációja 0,01–0,07 M között, a vele reakcióba lépő glükózé hasonló nagyságrendben változott.

A triptofán mennyiségét vizes oldatban egyrészt az alfa-aminonitrogént jellemző ninhidrines (8), másrészt az indolgyűrűre specifikus *Spies – Chambers* (9) féle dimetilaminobenzaldehides színreakcióval határoztuk meg.

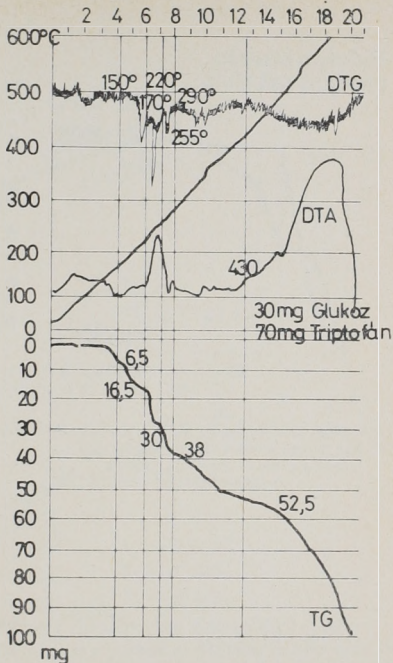
1. A magasabb hőmérsékleten végzett derivatográfias vizsgálatok eredményei sok hasonlóságot mutatnak a metionin-glükóz keverékéhez (6), azonban a triptofánnál bonyolultabb reakciókat figyelhetünk meg (1. ábra). A DTG görbe szerint a bomlás csúcsa a metioninhoz képest alacsonyabb hőmérsékleten (150 °C) kezdődik el és több csúcs is található. A Maillard-reakció kezdeti szakaszának két csúcsa felel meg (160 és 195 °C). Az aminosavbomlásra utaló csúcsok ugyancsak két lépcsőben végbemenő reakcióra utalnak (260 és 280 °C), mint ez a 2. ábrán a glükózt tartalmazó triptofán derivatogramján jól látható. A metioninnal ellentétben szublimáció jelensége nem észlelhető.

* Elhangzott a KÉKI által rendezett tudományos kollokviumon, 1975. márc. 28-án.



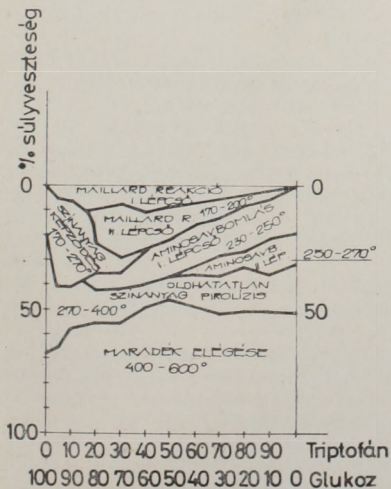
1. ábra

70 mg DL-triptofán és 30 mg glükóz nyitott térben felvett derivatogramja



2. ábra

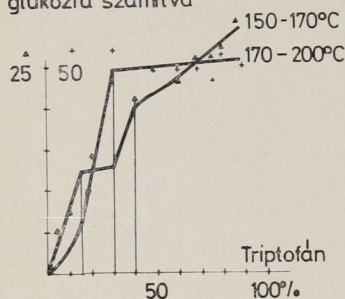
100 mg DL-triptofán nyitott térben felvett derivatogramja



3. ábra

Triptofán + glükóz elegy hőbomlásának súlyvesztés izotermái

%. Súlyvesztés
glükózra számítva



4. ábra

Derivatográfiával vizsgált Maillard-reakció első két lépcsőjének súlyvesztés izotermái a glükóz mennyiségére vonatkoztatva

[A] = aminosav [G] = glükóz

$$-\frac{d[A]}{dt} = [A]^{\alpha} \cdot [G]^{\gamma} = W$$

$$W_{01} = [A]_0^{\alpha} [G_1]_0^{\gamma} \quad [A]_0^{\alpha} = \text{konst.}$$

$$W_{02} = [A]_0^{\alpha} [G_2]_0^{\gamma}$$

$$\frac{W_{01}}{W_{02}} = \frac{[G_1]_0^{\gamma}}{[G_2]_0^{\gamma}}$$

$$\log W_{01} - \log W_{02} = \gamma (\log [G_1]_0 - \log [G_2]_0)$$

5. ábra

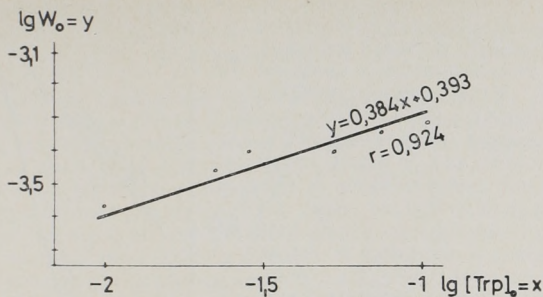
Reakció részrend meghatározásának elvi levezetése a kezdeti sebesség módszerével

Ha a különböző súlyarányú triptofán-glükóz elegyek derivatogramjairól az azonos hőmérsékletre tartozó súlyvesztés (TG) az összetétel függvényében ábrázoljuk, akkor a 3. ábrán bemutatott görbesereget kapjuk. Ezen az egyes izotermák (azonos hőmérsékletre tartozó súlyvesztés) által határolt területek a bomlás különböző lépcsőinek felelnek meg, áttekinthető módon. A Maillard-reakció első lépcsőjét jelző izoterma két helyen szélső értéket mutat. Az aminosav-főlétséget tartalmazó mintáknál a metioninnál tapasztalható szublimáció helyett itt az aminosavbomlás két lépcsőben jelenik meg.

Ha a Maillard-reakció két első lépcsőjének megfelelő 170 °C és 200 °C-os izotermák szerinti súlyvesztéseket a glükóz mennyiségére vonatkoztatjuk, akkor a 4. ábrán levő diagramhoz jutunk. Az első lépcső esetében két helyen, 15 és 40% triptofán súlyarányánál figyelhető meg egy-egy reakció lezáródása. A triptofán mennyiségének növelésével a második reakció lezáródása nem teljes. A 200 °C-os izotermánál 30% súlyarány fölött a triptofán már nem vesz részt a reakcióban, amelyet a görbén a plató kialakulása jelez. A 3. és 4. ábra tanúsága szerint vízmentes ömledékben a triptofán-glükóz maximális reakciója az 1:3, illetve 2:3 mól arány területén van, amely a difruktóstriptofán intermedier (10) jelenlétére enged következtetni.

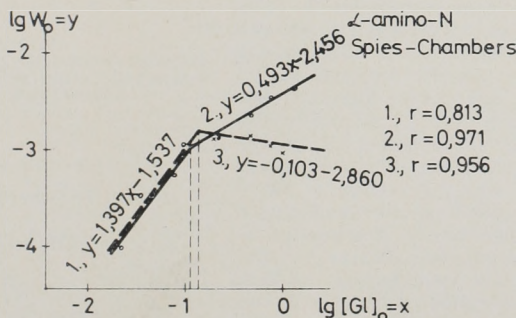
A triptofán-glükóz keverék derivatográfiás vizsgálata azt a feltételezést támogatja, hogy a triptofán két, egymástól reakcióképességben eltérő funkciós csoportja reagál.

2. Vizes oldatban meghatároztuk a Maillard-reakció bruttó folyamataira nézve a kinetikus részrendeket a kezdeti sebesség módszerével (11). A módszer elvi alapja a következő (5. ábra). A triptofán bomlási sebessége elsősorban az aminosav és a glükóz koncentrációjának függvénye, ahol alfa az aminosav, gamma a glükóz részrendje. Ha változtatjuk a glükóz koncentrációját, és mérjük pl. $(G_1)_0$ és $(G_2)_0$ kezdeti koncentrációnál a triptofán bomlásának kezdeti sebességét (W_0), akkor az aminosav koncentrációjának csökkenése elhanyagolható, te-



6. ábra

Triptofán bomlási sebességének logaritmususa a kezdeti triptofán-koncentráció logaritmusának függvényében (pH = 10, 130 C°)



7. ábra

0,05 M triptofán bomlásánál alfa-aminonitrogénre nézve 0,1 M glükózkoncentráció alatt 1,40, e fölött 0,49, a glükóz részrendűségére utaló kitevőt mértünk (7. ábra). A Spies – Chambers meghatározás alapján 0,1 M glükóz koncentráció fölött a triptofán bomlása gyakorlatilag független a glükóz mennyiségétől, azaz ilyen arányok mellett a glükóz érintetlenül hagyja az indolgyűrűt. A glükózra vonatkoztatott részrend 1:2 triptofán:glükóz mól arányánál változik meg, amely a difruktóstriptofán intermedier (10) fő szerepét húzza alá.

hát (A)^z állandó. A kétfajta kezdeti sebességi egyenletet elosztva, majd logaritmizálva olyan egyenlethez jutunk, amelynek segítségével a log (G)₀ és log (W)₀ koordináta rendszerben a mérések pontjai által meghatározott egyenes iránytangense a glükóz részrendjét adja meg. Analógia alapján a triptofán részrendjét az aminosavkoncentráció változtatásával, állandó glükózkoncentráció mellett állapítottuk meg.

A 6. ábra szerint a triptofán részrendjére utaló iránytangens 0,38. Mivel ez az érték nagyságrendileg az 1/2 rendhez áll közel, fel lehet tételezni, hogy a triptofánnak legalább két funkcionális csoportja vesz részt a Maillard-reakcióban.

0,05 M triptofán bomlásánál alfa-aminonitrogénre nézve 0,1 M glükózkoncentráció alatt 1,40, e fölött 0,49, a glükóz részrendűségére utaló kitevőt mértünk (7. ábra). A Spies – Chambers meghatározás alapján 0,1 M glükóz koncentráció fölött a triptofán bomlása gyakorlatilag független a glükóz mennyiségétől, azaz ilyen arányok mellett a glükóz érintetlenül hagyja az indolgyűrűt. A glükózra vonatkoztatott részrend 1:2 triptofán:glükóz mól arányánál változik meg, amely a difruktóstriptofán intermedier (10) fő szerepét húzza alá.

vizes oldatban (glükózra vonatkoztatva nagyságrendileg 1,5 reakciórend), akkor 1 mól triptofánnal 1 mól glükóz és 1 mól trióz reagál. Glükóz feleslegénél a reakciórend csökken és érvényesül a metioninnál is leírt triózon keresztül lefutó reakciót (6).

Spies-Chambers módszerrel mérve, difruktóztriptofánra vonatkoztatott glükóz feleslegben nem, triptofán feleslegnél a másik színreakcióval azonos módon tapasztaltunk triptofán bomlást. Mivel a *Spies-Chambers* féle színreakció végbemenéséhez az indolgyűrű 2-es helyzetében szubsztitúció nem lehet jelen (14), ezért feltételeztük triptofán feleslegénél az aminopropionsav résszel történő belső szubsztitúció bekövetkezését. Ez a kép egybeválik a *Bräutigam* (15) által leírt adatokkal, amelyek szerint triptofán Maillard reakciójánál karbolin-vázis vegyületeket izoláltak tömegspektrométerrel. A karbolin-vázis vegyületeknél az indolgyűrű 2-es szénatomja szubsztituált. Ez a kép összhangban van a 4. ábrán feltüntetett, derivatográfias vizsgálattal nyert 170 °C-os izoterma viselkedésével triptofán főlésgben.

Köszönetet mondunk Fodor Zsuzsannának és Csendes Jánosnéknak a kísérletes munkában nyújtott értékes közreműködésükért.

IRODALOM

- (1) *Vangala R. R., Menden E.*: ZUL 142, 195, 1970.
- (2) *Pelroy G. A., Spinelli J.*: J. Food. Sci., 36, 144, 1971.
- (3) *Badenhop A. F., Hackler L. R.*: J. Food Sci., 36, 1, 1971.
- (4) *Dworschák E., Hegedüs M.*: Acta Alimentaria Acad. Sci. Hung., 3, 337, 1974.
- (5) *Dworschák E., Czuczay P.*: Acta Pharm. Hung. 45, 40, 1975.
- (6) *Dworschák E., Órsi F., Telegdy Kováts M.*: ÉVIKE, 20, 23, 1974.
- (7) *Órsi F.*: Acta Alimentaria Acad. Sci. Hung., 1, 341, 1972.
- (8) *Cocking E. C., Yemm F. W.*: Biochem. J., 58, XII, 1954.
- (9) *Spies J. R., Chambers D. C.*: Anal. Chem., 20, 30, 1948.
- (10) *Anet E. F. L. J.*: Australian J. Chem., 12, 491, 1959.
- (11) *Schwetlick K.*: Kinetische Methoden zur Untersuchung von Reaktionsmechanismen. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1971.
- (12) *Spark A. A.*: J. Sci. Food Agric., 20, 308, 1969.
- (13) *Vukob K.*: A szaharóz hidrolízise és a hidrolízis-termékek bomlása, különös tekintettel a répacukor-gyártás műveleteire. Akadémia doktori értekezés, Budapest, 1964.
- (14) *Friedman M., Finley J. W.*: Agr. Food Chem., 19, 626, 1971.
- (15) *Bräutigam K. H., Severin T.*: ZUL. 154, 80, 1974.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ МАЙЛЛАРДА МЕЖДУ ТРИПТОФАНСМ И ГЛЮКОЗОЙ

Э. Дворшак и Ф. Ерши

В безводном расплаве триптофана и глюкозы дериватографическими исследованиями наблюдали следующие этапы реакции Майлларда: в пределах 150–200 °C первая фаза реакции Майлларда появляется в двух ступенях. Подобно двуступенчатому является также и расщепление аминокислоты в пределах температуры 230–270 °C. При температуре 270–400 °C красящие вещества терпят прилиз а остаточное вещество сгорает при температуре 400–600 °C. В изотерме первого этапа реакции Майлларда находим два пика. При термообработке водяного раствора при температуре 130 °C расщепление триптофана происходит прежде всего в результате присутствия продукта распада 3 валентного сахара, но необходимо учесть также и непосредственную реакцию глюкозы. Дифруктозтриптофан при промежуточной пропорции, в результате большого количества глюкозы способствует деградации частичной системы и не способствует изменению на индолевом ядре. В присутствии меньшего количества глюкозы вероятно 2-я субституция индолевого ядра.

Как кинетические испытания в водном растворе так и дериватографические испытания однозначно подтверждают присутствие группы ВН в индолевом ядре так и в реакции Майллара. Реакция Майллара триптофана увеличением рН, в результате базисного катализа повышалась до рН - 10,55 максимума, выше этой величины интенсивность уменьшалась, вероятно из-за образования глюкозы в оксикислоты.

UNTERSUCHUNG DER ZWISCHEN TRYPTOPHAN UND GLUCOSE STATTFINDENDEN MAILLARD-REAKTION

E. Dworschák und F. Örsi

In einer wasserfreien Schmelze von Tryptophan und Glucose konnte man mittels derivatographischer Untersuchungen die folgenden Phasen der Maillard-Reaktion beobachten: im Temperaturbereich 150–200 °C meldet sich die erste Phase der Maillard-Reaktion in zwei Stufen. Ähnlicherweise ist die Degradation der Aminosäure im Bereich 230–270 °C auch zweistufig. Zwischen 270 und 400 °C erleiden die Farbstoffe eine Pyrolyse, während das rückständige Material verbrennt bei 400–600 °C. In der Isotherme der ersten Phase der Maillard-Reaktion befinden sich zwei Spitzen.

Bei einer Wärmebehandlung bei 130 °C in einer wässrigen Lösung sind in erster Reihe die C₃ Zuckerdegradationsprodukte für die Zersetzung des Tryptophans verantwortlich, obwohl auch eine unmittelbare Reaktion der Glucose mitwirken mag. Eine grössere Menge von Glucose als die dem Difruktosertryptophan-Zwischenprodukt entsprechende Menge verursachte eine Degradation der partiellen Ordnung der Glucose und führte zu keine Änderungen in dem Indolring. In Anwesenheit von einer weniger Menge an Glucose ist eine Substitution in Stelle 2 des Indolringes wahrscheinlich.

Sowohl die in einer wässrigen Lösung durchgeführten kinetischen, wie auch die derivatographischen Untersuchungen bestätigen eindeutig die Teilnahme der im Indolring befindlichen NH-Gruppe in der Maillard-Reaktion.

Die Maillard-Reaktion des Tryptophans verstärkte sich mit der Erhöhung des pH-Wertes infolge Basenkatalyse bis zu einem Spitzenwert bei 10,55. Über diesen Wert verminderte sich die Intensität, wahrscheinlich infolge einer Umsetzung der Glucose in Oxysäuren.

INVESTIGATION OF THE MAILLARD REACTION BETWEEN TRYPTOPHAN AND GLUCOSE

E. Dworschák and F. Örsi

In an anhydrous melt of tryptophan and glucose the following phases of the Maillard reaction could be observed by means of derivatographic investigations. In the temperature range 140–200 °C the first phase of the Maillard reaction appeared in two steps. The decomposition of the amino acid proved to be similarly a two-step phase in the range 230–270 °C. In the range 270–400 °C the pigments undergo pyrolysis whereas the residual substances are oxidized at 400–600 °C. Two peaks appear in the isotherm of the first phase of the Maillard reaction.

On a heat treatment at 130 °C in an aqueous solution, tryptophan is decomposed. For this mainly the C₃ sugar degradation products are responsible but also a direct reaction of glucose may participate. A glucose amount higher than the

difructose tryptophan intermediate ratio caused a degradation of the partial order of glucose and did not result in any changes in the indole ring. In the presence of amounts of glucose less than this, a substitution on C₂ of the indole ring appears to be likely.

Both the kinetical investigations carried out in an aqueous solution and the derivatographic investigation proved unequivocally that also the NH-group present in the indole ring participates in the Maillard reaction.

On increasing the pH value, the Maillard reaction of tryptophan became stronger up to a peak value at pH 10.55, due to catalysis by base, then the intensity decreased, very likely on the effect of the conversion of glucose into oxyacids.

ETUDE DE LA RÉACTION MAILLARD ENTRE LE TRYPTOPHANE ET LA GLUCOSE₁

E. Dworschák et F. Örsi

On a pu observer, à l'aide d'études dérivatographiques, les étapes suivantes de la réaction de Maillard dans la coulée anhydre du tryptophane et du glucose: entre 150 et 200 °C la première phase de la réaction Maillard s'écoule en deux étapes. Similairement, la décomposition de l'acide aminé se passe en deux étapes entre 230 et 270 °C. Entre 270 et 400 °C les colorants subissent une pyrolyse, tandis que le résidue se consume entre 400 et 600 °C. Dans l'isotherme de la première phase de la réaction Maillard il y a deux pics.

Lors du traitement thermique à 130 °C en solution aqueuse ce sont les produits de décomposition du sucre à 3 atomes de carbone qui portent la responsabilité de la décomposition du tryptophane, cependant on peut tenir compte aussi de la réaction directe du glucose. Si la quantité du glucose surpassait la proportion intermédiaire du tryptophane-difructose, l'ordre partiel du glucose se décomposait et aucun changement ne survint dans l'anneau d'indol. En présence de moins de glucose une substitution en 2-ème place de l'anneau d'indol est probable.

Tant les études cinétiques effectuées en solution aqueuse que les examens dérivatographiques prouvent la participation du groupe NH de l'anneau d'indol dans la réaction Maillard.

En augmentent le pH, la réaction Maillard du tryptophane s'intensifiait dû à une catalyse de base, jusqu'à maximum an pH 10,55. A des valeurs plus hautes l'intensité diminuait, probablement à cause de la transformation du glucose en oxacides.